

Rafał Krenke¹, Aleksandra Safianowska¹, Magdalena Paplińska¹, Piotr Korczyński¹,
Barbara Dmowska-Sobstyl², Elżbieta Bogacka-Zatorska³, Andrzej Jaworski⁴, Ryszarda Chazan¹

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. Ryszarda Chazan

²Centralne Laboratorium, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. Dagna Bobilewicz

³Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. Aleksander Wasiutyński

⁴Oddział X Chorób Płuc i Gruźlicy, Mazowieckie Centrum Leczenia Gruźlicy i Chorób Płuc w Otwocku

Ordynator: lek. Jacek Jagodziński

Przydatność oznaczania interferonu gamma (IFN- γ) w płynie z opłucnej w diagnostyce gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej

Pleural fluid interferon-gamma (IFN- γ) measurement as a diagnostic tool
in tuberculous pleurisy

Abstract

Introduction: Tuberculosis is one of the most common causes of pleural effusion (PE). However, the diagnosis of tuberculous pleurisy still remains difficult. Since *M. tuberculosis* isolation rates in tuberculous effusions are relatively low the histological and microbiological studies of pleural biopsy samples are usually required to confirm the diagnosis. Several biological markers have been proposed to enhance the effectiveness of diagnosing patients with tuberculous pleurisy. The study was undertaken to evaluate the diagnostic accuracy of pleural fluid IFN- γ concentration in differentiation between tuberculous pleural effusion (TPE) and non-tuberculous pleural effusion (nTPE).

Material and methods: 94 patients (50 M and 44 F, mean age 59 ± 18 , range 18–95 years) with PE were studied. All subjects underwent diagnostic thoracentesis and extensive laboratory pleural fluid evaluation. Tuberculous pleural effusion was diagnosed in: 1) patients with positive pleural fluid or pleural biopsy culture and 2) patients with granulomas in the pleural biopsy specimen, after exclusion of other granulomatous diseases. IFN- γ level in pleural fluid was measured with commercially available immunoenzymatic assay (Quantikine Human IFN- γ Immunoassay, R&D Systems, USA).

Results: Tuberculous pleural effusion was diagnosed in 28 pts. The non-tuberculous pleural effusion group consisted of 66 pts, including 35 with malignant PE, 20 with parapneumonic effusion or pleural empyema, 5 with pleural transudates due to heart failure, and 6 with miscellaneous causes of PE. The mean concentration of IFN- γ was significantly higher in TPE than in nTPE (614.1 ± 324.5 vs. 15.1 ± 36.0 pg/ml, $p < 0.0001$). At the cut-off value of 100 pg/ml the sensitivity and specificity of the test were 100% and 98,5% respectively.

Conclusion: The pleural fluid concentration of IFN- γ was found to be highly sensitive and specific marker of tuberculous pleurisy.

Key words: pleural effusion, tuberculous pleural effusion, tuberculous pleurisy, gamma-interferon

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 237–245

Adres do korespondencji: Rafał Krenke, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UM w Warszawie, ul. Banacha 1A, 02–097 Warszawa, tel.: (022) 599 28 55, faks: (022) 599 15 60, e-mail: rafalkrenke@interia.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 30.10.2007 r.

Copyright © 2008 Via Medica

ISSN 0867–7077

Streszczenie

Wstęp: Mimo że gruźlicze zapalenie opłucnej stanowi jedną z częstszych przyczyn obecności płynu w jamie opłucnej, rozpoznanie choroby nie należy jednak do łatwych. Najważniejsze znaczenie diagnostyczne mają badania histologiczne i mikrobiologiczne biopłatów opłucnej. Prowadzi się także liczne badania nad innymi markerami gruźliczego zapalenia opłucnej. Celem badania była ocena przydatności oznaczania stężenia interferonu gamma (IFN- γ) w płynie opłucnowym jako metody diagnostycznej gruźliczego zapalenia opłucnej.

Materiał i metody: Badaną grupę stanowiło 94 chorych z płynem w opłucnej (44 kobiety i 50 mężczyzn, w wieku od 18 do 95 lat, średnia 59 ± 18 lat). U wszystkich wykonano punkcję opłucnej i badanie właściwości fizykochemicznych płynu (m.in. stężenie białka, aktywność dehydrogenazy mleczanowej [LDH, *lactate dehydrogenase*]). Dokonano także oceny całkowitej liczby komórek w płynie i ich składu odsetkowego. O innych badaniach diagnostycznych decydowały przesłanki kliniczne i wyniki badania płynu. Podstawę rozpoznania gruźliczej etiologii wysięku stanowiły: 1) dodatni wynik hodowli płynu lub biopłatu opłucnej lub 2) stwierdzenie ziarniny gruźliczopodobnej w biopłatach przy jednoczesnym wykluczeniu innych chorób mogących stanowić jej przyczynę. Stężenie IFN- γ w płynie opłucnowym oznaczano metodą ELISA (Quantikine Human IFN- γ Immunoassay, R&D Systems, USA).

Wyniki: Gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej rozpoznano u 28 osób. Wśród chorych z niegruźliczym płynem w opłucnej wyróżniono następujące podgrupy: wysięk nowotworowy ($n = 35$), wysięk parapneumoniczny/ropniak opłucnej ($n = 20$), przesięk w przebiegu niewydolności serca ($n = 5$) i inne rzadsze przyczyny płynu ($n = 6$). Średnie stężenie IFN- γ było znamienne wyższe u chorych z wysiękiem gruźliczym niż w pozostałej grupie chorych ($614,1 \pm 324,5$ vs. $15,1 \pm 36,0$ pg/ml, $p < 0,0001$). Przyjmując jako wartość odcinającą stężenie równe 100 pg/ml, czułość i swoistość testu dla rozpoznania gruźliczej etiologii wysięku wyniosły odpowiednio 100% i 98,5%.

Wniosek: Stężenie IFN- γ okazało się bardzo swoistym i czułym markerem pozwalającym na rozróżnienie gruźliczego wysięku w opłucnej od płynów o innej etiologii.

Słowa kluczowe: płyn w opłucnej, gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej, gruźlica opłucnej, interferon gamma

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 237–245

Wstęp

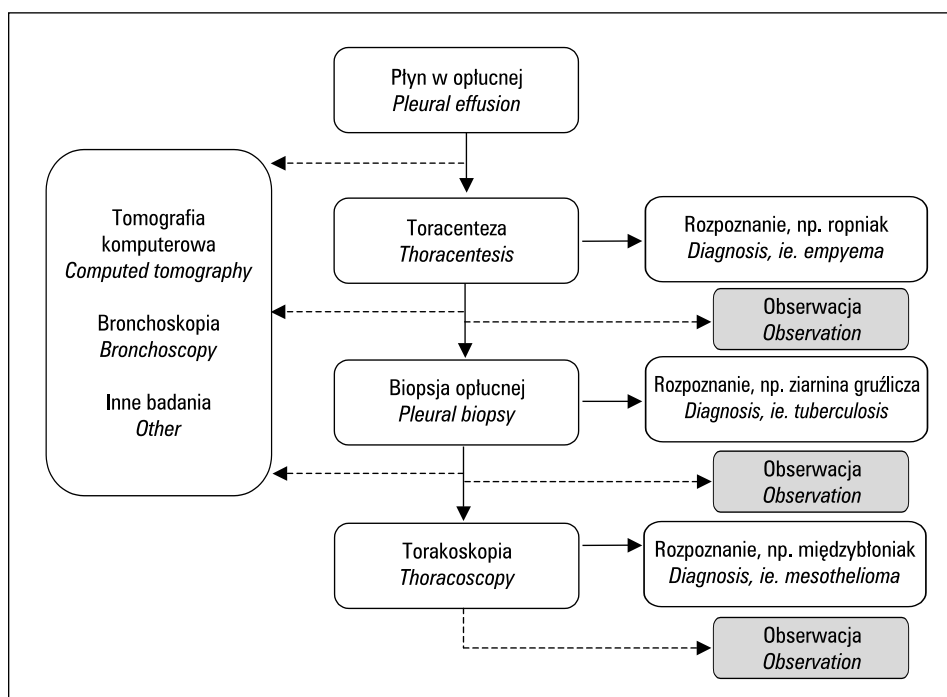
Mimo wprowadzenia i upowszechnienia nowych metod wykrywania i identyfikacji prątków z gatunku *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), rozpoznanie niektórych przypadków gruźlicy, w szczególności gruźlicy pozapłucnej, wciąż napotyka znaczne trudności. Przykładem takiego stanu rzeczy jest najczęstsza w Polsce postać gruźlicy pozapłucnej — gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej. Stosunkowo łatwy do pozyskania płyn opłucnowy jest materiałem ubogoprątkowym, dlatego wykrywanie w nim prątków gruźlicy cechuje się niską czułością diagnostyczną [1]. Znacznie lepszą skuteczność diagnostyczną pozwalającą osiągnąć badania materiałowych tkankowych (biopłaty opłucnowe). Ich pozyskanie wymaga jednak przeprowadzenia trudniejszych zabiegów, takich jak przezskórna biopsja opłucnej lub torakoskopia. Zbyt rzadkie stosowanie tych technik diagnostycznych może stanowić jedną z przyczyn zastanawiająco niskiego odsetka wykrywanych przypadków gruźliczego zapalenia opłucnej w stosunku do wszystkich przypadków gruźlicy odnotowywanych w Polsce. Według danych Zakładu Epidemiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w latach 2004–2006 odsetek ten wynosił 3,5–3,8%. W tej sytuacji celowe wydaje się poszukiwanie innych, mniej inwazyjnych metod diagnostyki gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej. Wykazano, że w prze-

biegu gruźliczego zapalenia opłucnej dochodzi do zwiększenia stężenia lub aktywności w płynie opłucnowym co najmniej kilku substancji, które pod pewnymi warunkami można wykorzystywać jako markery gruźliczej etiologii wysięku. Do tych substancji należą: interferon gamma (IFN- γ), deaminaza adenozy (ADA, *adenosine deaminase*), rozpuszczalny receptor interleukiny-2 (sRIL-2) i inne [2–4]. Celem pracy było określenie przydatności oznaczania stężenia IFN- γ w płynie opłucnowym w diagnostyce różnicowej etiologii płynu w jamie opłucnej.

Materiał i metody

Badanie przeprowadzono u 118 chorych z płynem w opłucnej przyjętych do Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii w latach 2004–2006. Diagnostykę przyczyn obecności płynu w opłucnej prowadzono według ogólnego schematu przedstawionego na rycinie 1.

U wszystkich chorych wykonano punkcję opłucnej i przeprowadzono badanie ogólne płynu obejmujące pomiary cech fizykochemicznych (ciężar właściwy, pH, stężenie białka, aktywność LDH, stężenie glukozy), jak również ocenę liczby i składu komórkowego. Różnicowania płynów przesiękowych i wysiękowych dokonano na podstawie kryteriów Lighta [5]. Dlatego oprócz pomiarów stężenia białka i aktywności LDH w płynie przepro-



Rycina 1. Schemat postępowania diagnostycznego u chorych z płynem w opłucnej

Figure 1. Diagnostic algorithm in patients with pleural effusion

wadzono odpowiednie oznaczenia we krwi obwodowej. U większości chorych przeprowadzono także badanie cytologiczne i mikrobiologiczne płynu. Metody wykrywania prątków kwasoopornych w płynie obejmowały bezpośrednią ocenę mikroskopową preparatów zabarwionych metodą Ziehl-Neelsena, hodowlę na podłożu Löwenstein-Jensen, a w niektórych przypadkach także identyfikację materiału genetycznego *M. tuberculosis* z zastosowaniem PCR (AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* test, Roche Diagnostics, Stany Zjednoczone). Próbkę płynu (średnia objętość 50 ml) służące oznaczeniu IFN- γ odwirowano (300 \times g, 10 min) i nadsącz zamrożono w temp. -70°C . O zakresie innych badań i zabiegów diagnostycznych przeprowadzonych u poszczególnych chorych (np. tomografia komputerowa, echokardiografia, przezskórna biopsja opłucnej, torakoskopia, bronchoskopia) decydowały przesłanki kliniczne i wyniki badania płynu opłucnowego. Biotaty opłucnej poddano ocenie histologicznej, a w wybranych przypadkach także badaniom mikrobiologicznym (identyfikacja prątków kwasoopornych — metodyka jak w przypadku płynu opłucnowego).

Na podstawie wyników badań wyłoniono grupę 94 chorych, u których udało się ustalić pewną lub co najmniej bardzo prawdopodobną przyczynę płynu w opłucnej — wśród nich znaleźli się chorzy z gruźliczym wysiękowym zapaleniem

opłucnej, płynem nowotworowym, wysiękiem parapneumonicznym i/lub ropniakiem opłucnej, przebiegiem w przebiegu niewydolności serca i marskości wątroby. Wyłoniono również grupę chorych z innymi, rzadszymi przyczynami płynu w opłucnej.

Definicje

Warunkiem rozpoznania gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej było spełnienie co najmniej jednego z poniższych warunków: 1) wykazanie obecności prątków MTB w płynie opłucnowym, biopatach opłucnej lub włóknikowych zrostach pobranych podczas torakoskopii; 2) wykazanie obecności typowej ziarniny gruźliczej w biopatach opłucnej; 3) bakteriologiczne potwierdzenie gruźlicy płuc przy jednoczesnym wykluczeniu innych możliwych przyczyn wysięku w opłucnej [4].

Nowotworowy wysięk w opłucnej rozpoznano w przypadkach, gdy: 1) w płynie opłucnowym i/lub biopatach opłucnej potwierdzono odpowiednio obecność komórek nowotworowych lub nacieku nowotworowego; 2) potwierdzono obecność nowotworu w innej lokalizacji przy wykluczeniu innych przyczyn wysięku w opłucnej. Płyn u chorych spełniających warunek 1. sklasyfikowano jako bezpośredni wysięk nowotworowy, natomiast płyn u chorych opisanych w punkcie 2. — jako pośredni wysięk nowotworowy [6].

Parapneumoniczny wysięk w opłucnej/ropniak opłucnej rozpoznano u chorych, u których: 1) podczas punkcji opłucnej uzyskano makroskopowo ropny płyn; 2) stwierdzono obecność drobnoustrojów w płynie z opłucnej lub 3) stwierdzono zapalenie płuc przebiegające z płynem w opłucnej, który ustąpił pod wpływem leczenia antybiotykami i/lub miejscowego leczenia drenażem opłucnej [7].

Przebieg w opłucnej rozpoznawano na podstawie kryteriów Lighta. Niewydolność serca jako przyczynę przebiegu rozpoznano na podstawie obrazu klinicznego, wyniku badania echokardiograficznego oraz po wykluczeniu zespołu nerczowego i marskości wątroby [8].

Wśród pozostałych przyczyn płynu wyodrębniono grupę chorych z różnorodnymi przyczynami wysięku (zespół pokardiotomijny, *trapped lung*, zator płucny).

Pomiary stężenia IFN- γ w rozmrożonych próbkach płynu wykonywano metodą immunoenzymatyczną, z wykorzystaniem komercyjnego zestawu (Quantikine Human INF- γ Immunoassay, R&D Systems, Stany Zjednoczone). Dokonując pomiarów w nierozcieńczonych próbkach, zakres mierzalnych wartości stężenia IFN- γ zawierał się w granicach 8–1000 pg/ml. W przypadkach, gdy stężenie IFN- γ przekraczało dolną lub górną granicę pomiaru, do obliczeń przyjęto odpowiednio: najmniejszą lub największą mierzalną wartość. Analizę statystyczną stężenia IFN- γ w wysiękach gruźliczych i niegruźliczych (i innych wybranych parametrów charakteryzujących wysięki) przeprowadzono z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya dla zbiorów niepowiązanych, przyjmując poziom istotności statystycznej, $p < 0,05$.

Wyniki

Gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej rozpoznano u 28 chorych. Obecność prątków MTB lub ich materiału genetycznego w płynie stwierdzono u 10 (35,7%) chorych. Oceniając skuteczność poszczególnych metod identyfikacji drobnoustrojów w płynie, stwierdzono 2 dodatnie wyniki uzyskane z zastosowaniem mikroskopii bezpośredniej (czułość 7%), 10 wyników dodatnich przy zastosowaniu metody hodowlanej (czułość 36%) i 4 wyniki dodatnie w metodzie genetycznej (czułość 14%). U 24 (85,7%) chorych wykazano obecność gruźliczopodobnej ziarniny w biopsjach opłucnej (18 biopsjów uzyskano drogą biopsji przezkórnej, a 6 — metodą torakoskopii). Mikrobiologiczne badania płwociny przeprowadzono u 12 chorych (wynik dodatni u 4 osób). U 16 osób wykonano ba-

danie bronchoskopowe. Wśród 13 osób, u których wykonano badanie popłuczyn oskrzelowych, u 5 wykazano obecność prątków MTB. Wyniki badania płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) pobranego od trzech chorych nie wykazały obecności prątków w materiale.

Płyn w opłucnej o etiologii niegruźliczej rozpoznano u 66 osób. Porównanie wybranych cech charakteryzujących chorych z gruźliczym i niegruźliczym płynem w opłucnej przedstawiono w tabeli 1. Dokładniejszą charakterystykę grupy chorych z niegruźliczym wysiękiem w opłucnej zamieszczono w tabeli 2.

Stężenie IFN- γ było znamienne wyższe w płynach o etiologii gruźliczej niż w pozostałych płynach ($614,14 \pm 324,53$ pg/ml vs. $15,08 \pm 35,97$ pg/ml; $p < 0,00001$) (ryc. 2).

Wśród płynów niegruźliczych najwyższe stężenie IFN- γ stwierdzono w wysiękach parapneumonicznych/ropniakach opłucnej ($23,58 \pm 62,88$ pg/ml). Było ono jednak znamienne niższe niż w wysięku gruźliczym ($p < 0,0001$). Najniższe stężenie IFN- γ stwierdzono w przebiegach u chorych z niewydolnością serca (8 ± 0 pg/ml). Przyjmując za wartość progową stężenie IFN- γ wynoszące 100 pg/ml, czułość rozpoznawcza dla gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej wyniosła 100%, a swoistość — 98,5%. Pozytywna wartość predykcyjna dla tej wartości stężenia wyniosła 96,6%, natomiast negatywna wartość predykcyjna — 100%.

Omówienie

Gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej stanowi jedną z najczęstszych postaci gruźlicy pozapłucnej. W Polsce odnotowuje się 300–400 przypadków rocznie, co stanowi około 3,5% wszystkich postaci gruźlicy pozapłucnej i stawia tę postać na pierwszym miejscu wśród pozapłucnych lokalizacji choroby [9].

Według danych ze Stanów Zjednoczonych, zebranych w późnych latach 80. ubiegłego wieku, gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej stanowiło drugą co do częstości lokalizację gruźlicy pozapłucnej. Dane epidemiologiczne dotyczące procentowego udziału wysięków gruźliczych wśród wszystkich przyczyn płynu w jamie opłucnej są bardziej zróżnicowane. W niektórych ośrodkach hiszpańskich jest to najczęstsza przyczyna wysięku w jamie opłucnej [10]. Z drugiej strony badania Marela i wsp. dowodzą, że w badanym regionie Czech jest to rzadka postać wysięku w opłucnej (wśród 142 chorych z płynem w jamie opłucnej nie odnotowano ani jednego przypadku wysię-

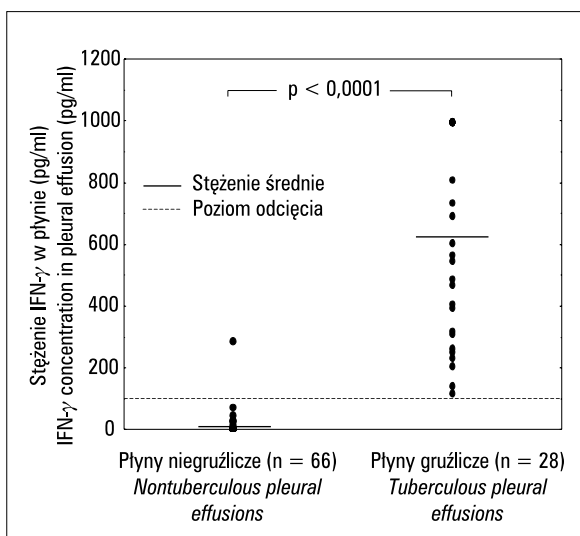
Tabela 1. Charakterystyka chorych z gruźliczym i niegruźliczym płynem w opłucnej**Table 1. Characteristics of patients with tuberculous vs. non-tuberculous pleural effusion**

	Gruźliczy wysięk w opłucnej (n = 28) <i>Tuberculous pleural effusion</i>	Niegruźliczy wysięk w opłucnej (n = 66) <i>Non-tuberculous pleural effusion</i>	Wartość p <i>p value</i>
Wiek (lata) <i>Age (years)</i>	46,7 \pm 20,1	64 \pm 14,6	p < 0,001
Płeć M/K <i>Sex M/F</i>	19 /9	31/35	
Temp ciała (°C) <i>Body temperature (°C)</i>	38,1 \pm 0,9	37,6 \pm 0,8	p < 0,05
Odczyn tuberkulinowy [mm] <i>TST [mm]</i>	12,5 \pm 7,5	4,7 \pm 6,7	p < 0,005
Stężenie białka w płynie [g/100 ml] <i>Pleural fluid protein concentration [G/dL]</i>	5,15 \pm 0,64	4,03 \pm 1,14	p < 0,0001
Aktywność LDH w płynie [jm./l] <i>Pleural fluid LDH [IU/L]</i>	2641 \pm 3920	3202 \pm 8635	NS
Liczba komórek w płynie [/mm ³] <i>Pleural fluid total cell count [/mm³]</i>	2738 \pm 1882	3999 \pm 13674	NS
Odsetek limfocytów w płynie (%) <i>Pleural fluid lymphocyte percentage (%)</i>	86 \pm 18	55 \pm 29	p < 0,0001
Liczba limfocytów w płynie [/mm ³] <i>Pleural fluid lymphocyte number [/mm³]</i>	2374 \pm 1622	1232 \pm 1648	p < 0,0001
Stężenie IFN- γ w płynie [pg/ml] <i>Pleural fluid IFN-γ concentration [pg/ml]</i>	614,14 \pm 324,53	15,08 \pm 35,97	p < 0,00001

TST (tuberculin skin test) — odczyn tuberkulinowy; LDH (lactate dehydrogenase) — dehydrogenaza mleczanowa

Tabela 2. Charakterystyka chorych z różnymi postaciami niegruźliczego płynu w opłucnej**Table 2. Characteristics of patients with non-tuberculous pleural effusion**

	Nowotworowy wysięk w opłucnej (n = 35) <i>Malignant pleural effusion</i>	Parapneumoniczny wysięk w opłucnej (n = 20) <i>Parapneumonic effusion/empyema</i>	Przesiek w niewydolności serca (n = 5) <i>Transudate (congestive heart failure)</i>	Pozostałe (n = 6) <i>Other</i>
Wiek (lata) <i>Age (year)</i>	68,1 \pm 9,8	56,3 \pm 17,8	73,4 \pm 18,6	58 \pm 12,6
Płeć M/K <i>Sex M/F</i>	13/22	11/9	3/2	4/2
Temp ciała (°C) <i>Body temperature (°C)</i>	37,2 \pm 0,5	38,5 \pm 0,6	36,8 \pm 0,2	37,5 \pm 0,6
Lokalizacja płynu P/L <i>Site of effusion (R/L)</i>	18/17	13/6	5/0	3/3
Stężenie białka w płynie [g/100 ml] <i>Pleural fluid protein concentration [G/dL]</i>	4,34 \pm 0,63	3,86 \pm 1,29	2,34 \pm 1,14	4,8 \pm 0,9
Aktywność LDH w płynie [jm./l] <i>Pleural fluid LDH [IU/L]</i>	1879 \pm 2025	6719 \pm 14648	202,2 \pm 63,96	1180 \pm 662
Liczba komórek w płynie [/mm ³] <i>Pleural fluid total cell count [/mm³]</i>	1551 \pm 1568	10173 \pm 25443	360 \pm 220	3190 \pm 2213
Stężenie IFN- γ w płynie [pg/ml] <i>Pleural fluid IFN-γ concentration [pg/ml]</i>	12,45 \pm 14,08	23,58 \pm 62,88	8 \pm 0	8 \pm 0



Rycina 2. Porównanie stężenia IFN- γ w gruźliczych i niegruźliczych wysiękach w opłucnej

Figure 2. IFN- γ concentration in tuberculous and nontuberculous pleural effusions

ku gruźliczego) [11]. W badaniu przeprowadzonym w Klinice Ftyzjopneumonologii Śląskiej Akademii Medycznej w latach 1990–1999 wykazano, że zakażenie gruźlicze było odpowiedzialne za prawie 1/3 (31,25%) wszystkich przypadków płynu w jamie opłucnej [12]. Jednak odsetek chorych z płynem o etiologii gruźliczej ulegał stopniowemu obniżeniu w ciągu 10-letniego okresu obserwacji. W materiale Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii AM w Warszawie z lat 2004–2006 gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej stanowiło przyczynę 11,5–15% płynów w opłucnej.

Na przedstawione wcześniej różnice w częstości gruźliczego wysięku w opłucnej bez wątpienia mają wpływ: lokalna sytuacja epidemiologiczna, profil ośrodka, w którym przeprowadzono badania, a także znaczne zróżnicowanie skuteczności metod diagnostycznych stosowanych dla potwierdzenia gruźliczej etiologii wysięku. Wiadomo, że wobec niewielkiej liczby prątków (lub ich nieobecności) w płynie opłucnowym, metody polegające na ich wykrywaniu w tym materiale cechują się małą czułością, wynoszącą od 0 do 5% dla mikroskopii bezpośredniej i od 25 do 37% dla badań hodowlanych [1, 13]. Najwyższą czułość diagnostyczną osiągającą 70–80% wykazują metody identyfikacji materiału genetycznego prątków w płynie. Zastosowanie tych metod w diagnostyce wiąże się jednak z kilku-, kilkunastoprocentowym prawdopodobieństwem wyników fałszywie dodatnich (swoistość około 90%) [4, 13]. Czułość poszczególnych metod identyfikacji prątków w płynie uży-

skana w naszym materiale odpowiada wyżej przytoczonym danym, z wyjątkiem metody genetycznej. Czułość mikroskopii bezpośredniej w naszym materiale wyniosła 7% (2/28), hodowli — 35,7% (10/28), natomiast metod genetycznych — tylko 14,3% (4/28). U obojga pacjentów, u których stwierdzono prątki w badaniu mikroskopowym płynu, potwierdzono ich obecność metodą hodowli oraz metodą genetyczną. Warto zwrócić uwagę, że u wszystkich 4 chorych, u których uzyskano dodatnie wyniki badania PCR, potwierdzenie obecności prątków w płynie uzyskano także pozostałymi metodami (u wszystkich dodatni wynik hodowli, a u połowy z nich także mikroskopii bezpośredniej). Wobec tego wynik badania PCR odegrał istotną rolę tylko u 2 chorych, u których pozwolił na szybszą diagnostykę gruźliczej etiologii wysięku. Metoda hodowlana okazała się najbardziej czuła, ponieważ pozwoliła na potwierdzenie obecności prątków w płynie u 6 osób, u których nie wykazano ich obecności ani za pomocą badania mikroskopowego, ani metody genetycznej.

Analiza podstawowych danych klinicznych badanej przez nas grupy chorych z gruźliczym wysiękowym zapaleniem potwierdza obserwacje poczynione przez innych, także polskich, badaczy: średnia wieku tej grupy chorych była znamienne niższa niż chorych z płynami o innej etiologii ($p < 0,001$), a ich średnia temperatura ciała znamienne wyższa niż u pozostałej grupy chorych ($p < 0,05$) [14]. We wstępnej diagnostyce różnicowej przyczyn płynu w jamie opłucnej istotne znaczenie może mieć fakt, że tylko u jednego chorego z gruźliczym zapaleniem opłucnej nie odnotowano gorączki (temp. $< 37,5^{\circ}\text{C}$).

Zarówno wyniki badań innych autorów, jak i własne zwracają uwagę, że najważniejszą rolę w diagnostyce gruźliczego zapalenia opłucnej odgrywają metody biopsyjne [15]. Jeśli w badanej grupie chorych takie metody nie byłyby zastosowane, czułość rozpoznawcza gruźliczego zapalenia opłucnej, uzyskana na podstawie dodatnich wyników badań mikrobiologicznych płynu opłucnowego oraz płwociny, popłuczyn oskrzelowych i BALF, wyniosłaby 46,4% (13/28). Dlatego też uważa się, że badania mające na celu ocenę przydatności innych metod diagnostyki gruźliczego wysięku w opłucnej powinny obejmować badanie materiałów tkankowych pozyskiwanych z opłucnej. Najpowszechniej wykorzystuje się w tym celu przezskórną biopsję opłucnej [16].

Poszukiwania innych skutecznych i mniej inwazyjnych metod diagnostyki gruźliczego zapalenia opłucnej trwają od lat. Jak dotąd, najbardziej obiecujące wyniki przynoszą pomiary stężenia lub

aktywności w płynie opłucnowym stosunkowo swoistych markerów zapalenia gruźliczego. Należą do nich deaminaza adenozy, IFN- γ oraz inne cytokiny i substancje pojawiające się w przebiegu zakażenia gruźliczego w płynie opłucnowym (np. IL-6, IL-12, IL-18, rozpuszczalny receptor IL-2, TNF- α) [2–4, 17, 18]. Dotychczasowe doświadczenia wykazują, że jednym z najbardziej czułych i swoistych markerów gruźliczej etiologii zapalenia opłucnej jest zwiększone stężenie IFN- γ w płynie opłucnowym [2, 13, 19]. Przyczyny zwiększonego stężenia IFN- γ w wysiękach o etiologii gruźliczej znajdują swe wyjaśnienie w komórkowych mechanizmach reakcji układu immunologicznego na zakażenie prątkami MTB. Ekspresja antygenów prątków na powierzchni komórek prezentujących prowadzi do aktywacji limfocytów T, zwiększenia ich liczby oraz wydzielania cytokin odgrywających rolę w dalszym przebiegu reakcji. Do takich cytokin należą IL-2 i IFN- γ . Wobec znanego faktu, że w przewlekłej fazie wysiękowego gruźliczego zapalenia opłucnej limfocyty T stanowią najliczniejszą grupę komórek obecnych w wysięku, oraz licznych dowodów, że stanowią one bogate źródło IFN- γ , nietrudno wytłumaczyć wysokie stężenie tego ostatniego w wysięku gruźliczym [20–22].

Redystrybucja limfocytów T i B między płynem opłucnowym i krwią obwodową oraz stymulacja komórek T obecnych w opłucnej tłumaczy także różnice między stężeniem IFN- γ w płynie i krwi obwodowej. W jednym z badań wykazano, że u chorych z gruźliczym wysiękiem w opłucnej mediana stężenia IFN- γ w płynie była ponad 60-krotnie wyższa niż jego stężenia we krwi [23]. Stosunek mediany stężenia IFN- γ w wysięku nowotworowym i we krwi obwodowej wynosił zero. Stężenie IFN- γ w gruźliczym wysięku opłucnowym może prawdopodobnie odzwierciedlać stopień stymulacji limfocytów T przez antygeny prątków gruźlicy [2]. IFN- γ wpływa na czynność innych komórek układu immunologicznego, posiada między innymi zdolność aktywacji i zwiększenia zdolności bakteriofagocytujących makrofagów w stosunku do prątków MTB.

Wykazanie wyraźnie zwiększonego stężenia IFN- γ w wysiękach gruźliczych spowodowało oczywiste zainteresowanie tą substancją jako potencjalnym narzędziem diagnostycznym. Opierając się na wynikach badań przeprowadzonych w latach 80. XX wieku wykazano, że wykorzystanie pomiaru stężenia IFN- γ w płynie opłucnowym dla rozpoznania gruźliczej etiologii płynu charakteryzuje się doskonałą czułością i swoistością (100%) [24]. Na podstawie kolejnych badań przeprowadzonych w latach 90. ubiegłego wieku potwierdzono wysoką czułość, swoistość i skuteczność dia-

gnostyczną pomiaru stężenia IFN- γ w diagnostyce gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej, jednak wyniki badań nie były już tak znakomite jak poprzednio cytowane [14, 25–28] — według tych autorów czułość pomiaru stężenia IFN- γ w diagnostyce gruźliczego zapalenia opłucnej wahała się w granicach 85,7–100%, swoistość — 95–97% i skuteczność diagnostyczna — 92,4–97,5%. Metodyka oznaczania stężenia IFN- γ stosowana w większości badań jest bardzo podobna i opiera się na wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów do badań immunoenzymatycznych (ELISA). Tylko kilka ośrodków prowadziło badania z zastosowaniem metod radioimmunologicznych (RIA). Zestawy pochodzące od różnych producentów różnią się zakresem możliwych pomiarów. Autorzy niniejszego opracowania stosowali zestaw umożliwiający pomiar stężenia IFN- γ w zakresie od 8 do 1000 pg/ml. U 9/28 (32%) chorych z płynem o etiologii gruźliczej stężenie IFN- γ w płynie przekraczało 1000 pg/ml. Ustalając wartość odcięcia przy stężeniu IFN- γ wynoszącym 100 pg/ml uzyskano czułość diagnostyczną wynoszącą 100%, swoistość — 98,5%, negatywną wartość predykcyjną — 100% i pozytywną wartość predykcyjną — 96,6%. Wyniki autorów niniejszej pracy są bardzo zbliżone do uzyskanych przez innych, choć przyjmowane przez nich wartości stężenia odcinającego były różne i wahały się od 1,5 do nawet 300 pg/ml [29–31]. W przypadku stosowania metod RIA wartość odcięcia ustalano w innych jednostkach, co nie miało jednakże negatywnego wpływu na czułość i swoistość metody.

W 2003 roku ukazała się metaanaliza podsumowująca wyniki 13 badań nad wartością oznaczania IFN- γ w diagnostyce gruźliczego wysięku w opłucnej, przeprowadzonych w latach 1978–2000 [32]. Łączna ocena skuteczności testu (czułość i swoistość wyrażona wartością Q na krzywej ROC) wyniosła 96%.

Kolejną metaanalizę opublikowano w kwietniu 2007 roku [29]. Objęła ona 11 badań, które stanowiły przedmiot wcześniejszej metaanalizy i kolejnych 11 badań opublikowanych w latach 2001–2006. W 22 badaniach uczestniczyło łącznie 782 chorych z gruźliczym wysiękiem w opłucnej i 1319 chorych z płynem o innej etiologii. Autorzy zwrócili szczególną uwagę na odpowiednią ocenę jakości poszczególnych badań, a także na wyczerpujące opracowanie statystyczne wyników. Na podstawie metaanalizy potwierdzono wyjątkowo wysoką ocenę swoistości testu dla rozpoznania gruźliczego wysięku w opłucnej, która wyniosła 97% (zakres w analizowanych badaniach od 86 do 100%). Nieco więcej rozbieżności stwierdzono podczas analizy czułości

metody (zakres 64–100%). Średnia czułość wyniosła 89%. Należy zwrócić uwagę, że aż w 10 z 22 analizowanych prac swoistość oznaczania stężenia IFN- γ w płynie opłucnowym dla diagnostyki gruźliczego zapalenia opłucnej wyniosła 100%, a w 5 z nich wykazano równie wysoką (tj. 100%) czułość. Wyniki własne autorów niniejszej pracy wpisują się więc w światową opinię na temat przydatności badania IFN- γ w diagnostyce gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej.

Dotychczasowe próby praktycznego zastosowania pomiaru stężenia IFN- γ w płynach ustrojowych nie ograniczają się wyłącznie do wysięku opłucnowego. Wykazano, że wysięki gruźlicze w innych jamach ciała także charakteryzują się podwyższonym stężeniem IFN- γ [33, 34]. Sharma i wsp. stwierdzili, że wysokie stężenie IFN- γ jest wartościowym markerem gruźliczej etiologii wysięku w otrzewnej. Czułość, swoistość i skuteczność rozpoznawcza oznaczania stężenia IFN- γ w płynie otrzewnowym dla rozpoznania gruźliczego zapalenia otrzewnej (za stężenie różnicujące przyjęto 112 pg/ml) wyniosły odpowiednio 96,8%, 96,6% i 96,6% [33]. Burgess i wsp. przeprowadzili badanie przydatności oznaczania IFN- γ w diagnostyce różnicowej płynu w osierdziu. Autorzy ci wykazali, że przyjęcie wartości granicznej stężenia IFN- γ , wynoszącej > 200 pg/l pozwoliło na wyodrębnienie wszystkich chorych z wysiękiem gruźliczym (czułość 100%), bez ani jednego wyniku fałszywie dodatniego (swoistość 100%) [34].

Pomiar intensywności wydzielania IFN- γ przez limfocyty krwi obwodowej po stymulacji antygenem prątków MTB stanowi podstawę testów diagnostycznych cechujących się większą czułością i swoistością w rozpoznawaniu utajonego zakażenia prątkami MTB niż skórny odczyn tuberkulinowy. Prowadzone są także badania nad przydatnością pomiaru wydzielania IFN- γ przez swoście aktywowane limfocyty płynu opłucnowego [35].

Wnioski

Pomiar stężenia IFN- γ w płynie z jamy opłucnej jest badaniem mogącym odgrywać istotną rolę w rozpoznaniu gruźliczej etiologii wysięku. Pod względem czułości i swoistości niemal nie ustępuje metodom biopsyjnym uznawanym za „złoty standard” diagnostyki gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej. Jego zastosowanie w praktyce mogłoby przyczynić się z jednej strony do ograniczenia liczby zabiegów diagnostycznych cechujących się większym stopniem inwazyjności, zaś z drugiej — do zmniejszenia liczby chorych, u których podejmuje się leczenie przeciwgruźlicze bez

potwierdzenia gruźliczej etiologii wysięku. Zastosowanie komercyjnych zestawów do pomiaru stężenia IFN- γ daje nadzieję na możliwość szerszego stosowania metody.

Piśmiennictwo

- Valdés L., Álvarez D., San José E. i wsp. Tuberculous pleurisy: a study of 254 cases. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158: 2017–2021.
- Hiraki A., Aoe K., Eda R. i wsp. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 2004; 125: 987–989.
- Safianowska A., Krenke R., Dmowska-Sobstyl B. i wsp. Aktywność deaminazy adenozyiny w gruźliczym i nowotworowym wysięku w opłucnej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 5–9.
- Valdés L., Pose A., San José E., Vázquez J.M.M. Tuberculous pleural effusion. *Eur. J. Intern. Med.* 2003; 14: 77–88.
- Light R.W. Diagnostic principles in pleural disease. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 476–481.
- Sahn S.A. Pleural diseases related to metastatic malignancies. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1907–1913.
- Hamm H., Light R.W. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1150–1156.
- Kinasewitz G.T. Transudative effusions. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 714–718.
- Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc — Zakład Epidemiologii i Organizacji Walki z Gruźlicą: Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w roku 2006. Szczuka I. (red.). Warszawa 2007.
- Valdés L., Álvarez D., Valle J.M., Pose A., San José E. The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest* 1996; 109: 158–162.
- Marel M., Zrustová M., Stasny B., Light R.W. The incidence of pleural effusion in a well-defined region: epidemiologic study in Central Bohemia. *Chest* 1993; 104: 1486–1489.
- Kolczyński A. Etiologia płynów opłucnowych w materiale Szpitala Chorób Płuc i Gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2001; 69: 239–246.
- Villegas M.V., Labrada L.A., Saravia N.G. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2000; 118: 1355–1364.
- Pawlukiewicz M., Lis A., Kubit-Lis M., Górski-Kowalska J., Wolan T. Etiologia płynów opłucnowych w materiale własnym. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1996; 64: 427–430.
- Diacon A.H., Van der Wall B.V., Wyser C. i wsp. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 589–591.
- Droszcz W. Biopsja opłucnej. W: Choroby opłucnej. Droszcz W. (red.). PZWL, Warszawa 1997: 50–56.
- Wong C-F., Yew W-W., Leung S.K-F. i wsp. Assay of pleural fluid interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the diagnosis and outcome correlation of tuberculous effusion. *Respir. Med.* 2003; 97: 1289–1295.
- Yamada A., Nakamura A., Hosoda M. i wsp. Cytokines in pleural liquid for diagnosis of tuberculous pleurisy. *Respir. Med.* 2001; 95: 577–558.
- Aoe K., Hiraki A., Murakami T. i wsp. Diagnostic significance of interferon-gamma in tuberculous pleural effusions. *Chest* 2003; 123: 740–744.
- Petersson T., Klockars M., Hellström P.E., Riska H., Wangel A. T and B lymphocytes in pleural effusions. *Chest* 1978; 73: 49–51.
- Barnes P.F., Mistry S.D., Cooper C.L., Pirmez C., Rea T.H., Modlin R.L. Compartmentalization of a CD41 T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J. Immunol.* 1989; 142: 1114–1119.
- Barnes P.F., Fong S.J., Brennan P.J., Twomey P.E., Mazumder A., Modlin R.L. Local production of tumour necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J. Immunol.* 1990; 145: 149–154.
- Chen Y-M., Yang W-K., Whang-Peng J., Tsai C-H., Perng R-P. An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 31: 25–30.
- Ribera E., Ocaña I., Martínez-Vázquez J.M., Rossell M., Español T., Ruibal A. High level of interferon gamma in tuberculous pleural effusion. *Chest* 1988; 93: 308–311.

25. Shimokata K., Saka H., Murate T., Hasegawa Y., Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion: comparison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest* 1991; 99: 1103–1107.
26. Valdés L., San José E., Álvarez D. i wsp. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon gamma. *Chest* 1993; 103: 458–465.
27. Villena V., López-Encuentra A., Echave-Sustaeta J., Martín-Escribano P., Ortuño-de-Solo B., Estenoz-Alfaro J. Interferon-gamma in 388 immunocompromised and immunocompetent patients for diagnosing pleural pleural effusions. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 2635–2639.
28. Wongtim S., Silachamroon U., Ruxrungtham K. i wsp. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax* 1999; 54: 921–924.
29. Jiang J., Shi H-Z., Liang Q-L., Qin S-M., Qin X-J. Diagnostic value of interferon-gamma in tuberculous pleurisy: A metaanalysis. *Chest* 2007; 131: 1133–1141.
30. Maeda J., Ueki N., Ohkawa T. i wsp. Local production and localization of transforming growth factor in tuberculous pleurisy. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 92: 32–38.
31. Soderblom T., Nyberg P., Teppo A.M., Klockars M., Riska H., Pettersson T. Pleural fluid interferon-g and tumor necrosis factor-a in tuberculous and rheumatoid pleurisy. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 1652–1655.
32. Greco S., Girardi E., Masciangelo R., Capocchetta G.B., Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003; 7: 777–786.
33. Sharma S.K., Tahir M., Mohad A., Smith-Rohrberg D., Mishra H.K., Pandey R.M. Diagnostic accuracy of ascitic fluid IFN- and adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculous ascites. *J. Interf. Cytok. Res.* 2006; 26: 484–488.
34. Burgess L.J., Reuter H., Carstens M.E., Taljaard J.J.F., Doubell A.F. The use of adenosine deaminase and interferon-g as diagnostic tools for tuberculous pericarditis. *Chest* 2000; 122: 900–905.
35. Gopi A., Madhavan S.M., Sharma S.K., Sahn S.A. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131: 880–889.